饲粮蛋白质水平对意大利蜜蜂归巢能力及记忆相关基因表达的影响[1]

袁　安　郭亚惠　吴小波*　黄　晓　廖春华

（江西农业大学蜜蜂研究所，南昌 330045）

摘　要：本试验旨在研究蛋白质水平对意大利蜜蜂归巢能力及记忆相关基因表达的影响。选择 9 群群势相当的本地意大利蜜蜂，随机分为 3 组，每组 3 群。Ⅰ组、Ⅱ组、Ⅲ组分别饲喂蛋白质水平为 15%、25%、35%的试验饲粮。饲喂 45 d 后，测定采集蜂分别在 1 000、2000 m 处的回归率及不同日龄（刚出房、10 日龄、20 日龄）工蜂 3 个记忆相关基因[谷氨酸受体基因（*GluRA*）、N-甲基-*D* 天冬氨酸受体基因（*Nmdar*1）、酪胺受体基因（*Tyr*1）]的表达情况。结果表明：Ⅱ组和Ⅲ组蜜蜂在 1 000、2 000 m 处的回归率均显著高于Ⅰ组（*P*<0.05），但Ⅱ组与Ⅲ组之间差异不显著（*P*>0.05）；Ⅲ组 10 和 20 日龄工蜂的 *GluRA* 相对表达量显著高于Ⅱ组和Ⅰ组（*P*<0.05），且Ⅱ组工蜂的 *GluRA* 相对表达量也显著高于Ⅰ组（*P*<0.05）；Ⅱ组和Ⅲ组 10 和 20 日龄工蜂的 *Nmdar*1 相对表达量显著高于Ⅰ组（*P*<0.05），但Ⅱ组与Ⅲ组之间差异不显著（*P*>0.05）；Ⅱ组和Ⅲ组 10 日龄工蜂的 *Tyr*1 相对表达量显著高于Ⅰ组（*P*<0.05），但Ⅱ组与Ⅲ组之间差异不显著（*P*>0.05）；各试验组刚出房工蜂的 *GluRA*、*Nmdar*1、*Tyr*1 以及 20 日龄工蜂的 *Tyr*1 相对表达量差异均不显著（*P*>0.05）。由此得出，饲粮蛋白质水平过低会影响意大利蜜蜂的归巢能力及记忆相关基因的表达。

关键词：意大利蜜蜂；蛋白质水平；回归率；记忆基因

中图分类号：S894　　文献标识码：A　文章编号：

蜜蜂是一种典型的社会性经济昆虫，属于节肢动物门(Arthropoda)，昆虫纲(Insecta)、膜翅目(Hymenoptera)，蜜蜂总科(Apoidea)，蜜蜂科(Apidae)，蜜蜂属(*Apis*)[1]，其作为生态系统中的重要成员，对生物多样性的促进和生态平衡的维持具有重要意义。但自从 2006 年冬季以来，蜂群崩溃失调病（colony collapse disorder，CCD）席卷了美国、法国、瑞典、德国和澳大利亚等国，致使当地蜂农蜂群损失达 50%~90%。CCD 的症状为蜂群中大量的成年工蜂短时间内突然消失在巢外，没有发现尸体，只剩下蜂王、卵、一些未成年的工蜂和大量蜜

收稿日期：2015-09-15
基金项目：国家自然科学基金项目（31360587）
作者简介：袁　安（1989—），男，江西万载人，硕士研究生，从事养蜂学研究工作。E-mail: 1248215336@qq.com
*通信作者：吴小波，副教授，E-mail: wuxiaobo21@163.com

粉残留于巢脾里。诱发 CCD 的因素可能是疾病、农药、气候、营养等[2-4]，但还没有确定的答案。营养可能是 CCD 发生的主要因素之一，营养不良会影响蜜蜂的机体发育，甚至影响蜜蜂的记忆归巢能力和记忆相关基因表达，从而导致蜜蜂迷失方向并消失在巢外。但关于蜜蜂学习记忆相关基因表达的报道较少，科研人员通过克隆等试验推测西方蜜蜂的酪胺受体（tyramine receptor）1 型基因（*Tyr*1）、N-甲基-*D*-天冬氨酸受体(N-methyl-*D*-aspartic acid receptor)1 型基因（*Nmdar*1）以及谷氨酸受体 A（glutamate receptor）A 型基因（*GluRA*）是参与西方蜜蜂学习记忆的重要基因[5-7]。近年来，蜜蜂蛋白质营养需要研究取得了阶段性成果，研究发现蛋白质水平会影响卵的孵化率、幼虫化蛹率和机体抗氧化活性等[8-12]，但还没有关于蛋白质水平是否会影响蜜蜂的归巢能力及其记忆基因表达的报道。基于此，本试验拟研究不同蛋白质水平对蜜蜂归巢能力及记忆相关基因表达的影响，为探索 CCD 致病因素提供一些依据。

1　材料与方法

1.1　试验动物

试验动物为江西农业大学蜜蜂研究所饲养的意大利蜜蜂（*Apis mellifera ligustica*），简称意蜂。

1.2　主要试剂及器材

人工代用花粉(不同蛋白质水平的饲粮，由山东农业大学提供)，油菜蜜，蜜蜂无线射频识别（RFID）记录系统（广州市远望谷信息技术有限公司），GPS 全球定位仪（eTrex Vista HCX），Trizol 总 RNA 提取试剂盒和 RNA 酶抑制剂（北京全式金公司），dNTP Mixture 和 oligo(dT)由上海英杰公司合成，M-MLV 反转录酶和荧光染料 SYBR® Premix Ex Taq™ II购自 TaKaRa 公司，自制小木箱（25 cm×25 cm×20 cm），定量聚合酶链式反应(PCR)仪(iQTM2 型，Bio-Rad 公司)，核酸蛋白测定仪(NanoPhotometerTM P300，IMPLEN)。

1.3　试验设计

1.3.1　蜂群的选择与饲养管理

选取群势相当的本地意大利蜜蜂（群内无花粉脾）9 群，随机分为 3 组，每组设 3 个重复。试验开始前将各试验组蜂群群势调整至 5 足框，之后每组分别饲喂蛋白质水平为 15%、25%、35%的试验饲粮，具体饲粮配方参照文献[10]。因试验期间外界有粉源，所以整个试

验期间试验蜂群安装脱粉器，并奖励饲喂糖水。将 3 种不同蛋白质水平的配合饲粮分别按人工饲料：糖：蜜(2：3：1)的比例混匀后加入适量水，反复揉搓，直到攥成团状为止。将饲粮制成饼状，每群每次饲喂 400 g，放置在梁框上供蜜蜂采食，每 3 d 更换 1 次饲粮。连续饲喂 45 d 后进行后期的检测试验。

1.3.2　蛋白质水平对采集蜂归巢能力的影响

用吸蜂机在巢门口抓取带花粉的采集蜂，参照何旭江[13]的试验方法对采集蜂进行电子标记，利用 GPS 全球定位仪分别在距离蜂巢 1 000、2 000 m 处进行精确定位，将带标签且采食足量糖水的蜜蜂带至目的地点放飞，利用蜜蜂 RFID 记录系统对其回巢情况进行记录，重复 6 次。

放飞蜜蜂有效数：在 5 min 之内蜜蜂起飞归巢的数量，剔除未能进行正常飞行的蜜蜂。

回归率=回巢蜜蜂数/放飞蜜蜂有效数。

1.3.3　蛋白质水平对工蜂记忆相关基因相对表达量的影响

1.3.3.1　样品采集

采取每群刚出房、10 日龄和 20 日龄工蜂各 20 只，分别装入 1.5 mL RNase-free 的 EP 管，迅速放入液氮中，用于后续检测。

1.3.3.2　RNA 的提取与 cDNA 的合成

取 3 只同一蜂群、同一日龄的蜜蜂头部混合为 1 个样品，放入含液氮的研钵内，研磨至粉末状后移置加有 1 mL Trizol 的 1.5 mL EP 管中。参考秦秋红[14]试验方法对样本 RNA 进行提取。最后所得总 RNA 通过琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 完整性。用核酸蛋白测定仪测定 260 和 280 nm 处吸光度值（OD）的比值（$OD_{260/280}$）（1.9~2.1 之间符合标准）和 RNA 浓度，每个样品测定 3 次，取平均值。

用反转录试剂盒对总 RNA 进行反转录，反应体系为 50 μL，包含：8 μL 总 RNA，10 μL Buffer，8 μL dNTP Mixture，1.5 μL M-MLV，3 μL Oligo(dT)，1 μL RNA 酶 Inhibitor，18.5 μL 焦碳酸二乙酯（DEPC）水。反转录反应条件如下：体系混匀后，42 ℃反应 60 min，75 ℃灭活 5 min。反转录产物保存于-80 ℃。

1.3.3.3　荧光定量 PCR 引物的设计及荧光定量 PCR

根据美国国立生物技术信息中心（NCBI）网站上所示西方蜜蜂基因组序列，用 Primer 5.0

软件设计引物序列(表 1)。因磷酸甘油醛脱氢酶基因（*GAPDH*）在蜜蜂发育过程中表达较稳定[15]，所以本试验以 *GAPDH* 作为内参基因。

荧光定量 PCR 反应体系（10 μL）：cDNA 1 μL，SYBR® Premix Ex Taq™ II 5 μL，上游与下游引物各 0.4 μL，超纯灭菌水 3.2 μL，混匀，离心，放入定量 PCR 仪中进行扩增。荧光定量 PCR 反应条件：95 ℃预变性 30 s；40 个 PCR 循环(95 ℃，10 s；60 ℃，1 min)。扩增反应结束后从 55 ℃缓慢加热至 95 ℃（每 10 s 升高 0.5 ℃），建立熔解曲线。每个 cDNA 重复 3 孔，并参考 Huang 等[15]的方法计算各个目的基因的相对表达量。

表 1　荧光定量 PCR 引物序列

Table 1　Primer sequences used in real time quantitative PCR

基因名称 Gene names	上游引物 Forward primer (5′-3′)	下游引物 Reverse primer (5′-3′)
谷氨酸受体 A 型基因 *GluRA*	ACTCTGTTCGTCTGTGGGGTG	TTCGTTAGAAGGGCAGCGTA
N-甲基-*D* 天冬氨酸受体 1 型基因 *Nmdar*1	GTATTTCCGTCGCCAAGTC	TGTAAACCAATCCCATAGCCA
酪胺受体 1 型基因 *Tyr*1	CGTCGGGCGAGCGAGATA	GCCAAACCAACCAGCAAAT
甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 *GAPDH*	GCTGGTTTCATCGATGGTTT	ACGATTTCGACCACCGTAAC

1.4　数据处理

采用 StatView 软件“ANOVA and *t*-test”中的“ANOVA or ANCOVA”对试验数据进行统计分析。

2　结　果

2.1　饲粮蛋白质水平对采集蜂归巢能力的影响

由表 2 可知，II组和III组采集蜂在 1 000、2 000 m 处的回归率均显著高于I组（P<0.05），但II组与III组之间差异不显著（P>0.05）。

表 2　饲粮蛋白质水平对意大利蜜蜂回归率的影响

Table 2　Effects of dietary protein level on homing rate of foragers　　%

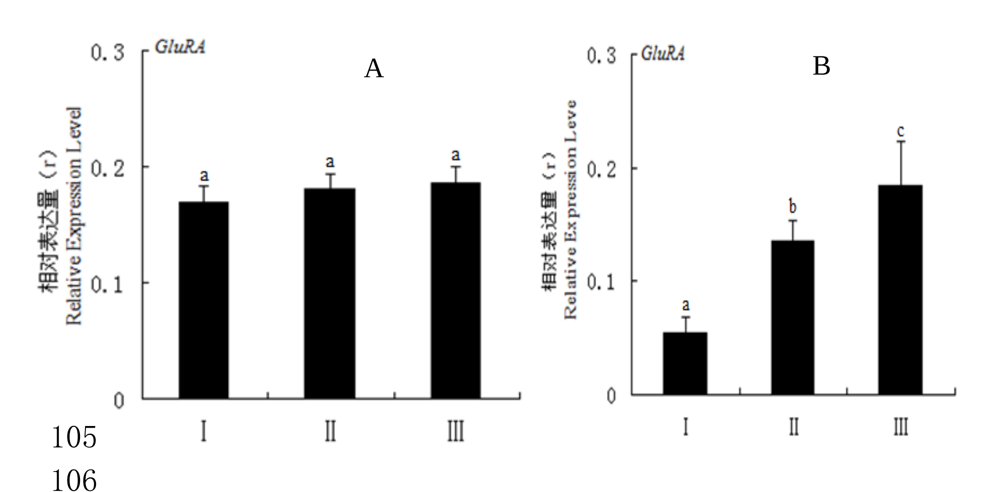
距离 Distance/m	组别 Groups		
	I	II	III
1 000	67.34±7.04[a]	72.77±5.55[b]	72.09±3.92[b]
2 000	38.87±4.73[a]	49.16±3.37[b]	48.65±4.40[b]

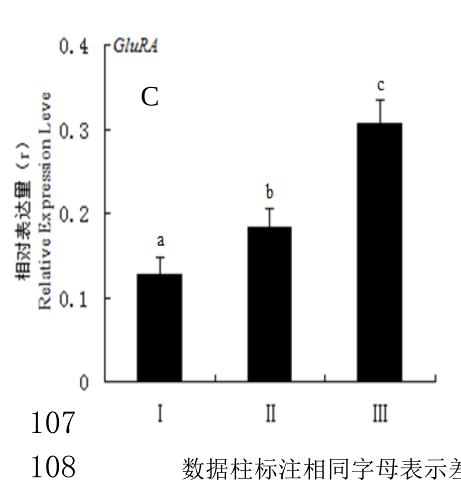
同行数据肩标相同字母表示差异不显著，不同字母表示差异显著（P<0.05）。

Values in the same row with the same letter superscripts mean no significant difference （P>0.05）, while with different letter superscripts mean significant difference （P<0.05）.

2.2　饲粮蛋白质水平对工蜂 *GluRA* 相对表达量的影响

试验结果如图 1 所示。各试验组刚出房工蜂的 *GluRA* 相对表达量差异不显著（P>0.05）。III组 10 和 20 日龄工蜂的 *GluRA* 相对表达量显著高于II组和I组（P<0.05），II组工蜂的 *GluRA* 相对表达量则显著高于I组（P<0.05）。





数据柱标注相同字母表示差异不显著（P>0.05），不同字母表示差异显著（P<0.05）；图 A、B、C 分别表示为刚出房工蜂、10 日龄工蜂、20 日龄工蜂。下图同。

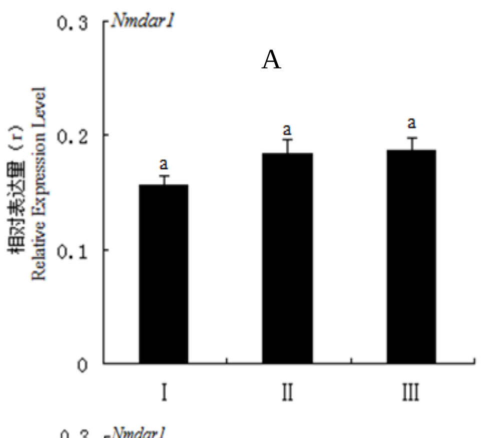
Date columns with the same letters mean no significant difference （P>0.05）, while with different letters mean significant difference （P<0.05）; the figures of A, B, C mean newly emerged bee, 10-day-old bee and 20-day-old bee. The same as below.

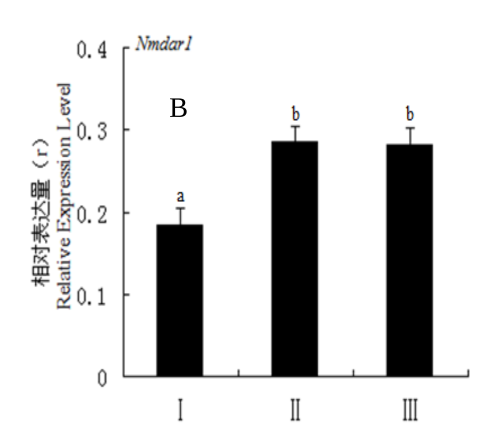
图 1　饲粮蛋白质水平对工蜂 *GluRA* 相对表达量的影响

Fig.1　Effects of dietary protein level on the relative expression level of *GluRA* of worker bees

2.3　饲粮蛋白质水平对工蜂 *Nmdar*1 相对表达量的影响

试验结果如图 2 所示。各试验组刚出房工蜂的 *Nmdar*1 基因表达量差异不显著（P>0.05）。II组和III组 10 和 20 日龄工蜂的 *Nmdar*1 相对表达量显著高于I组（P<0.05），但II组与III组之间差异不显著（P>0.05）。





C

相对表达量（r）

Relative Expression Leve

0.3 Nmdar1

0.2

0.1

0

a　b　b

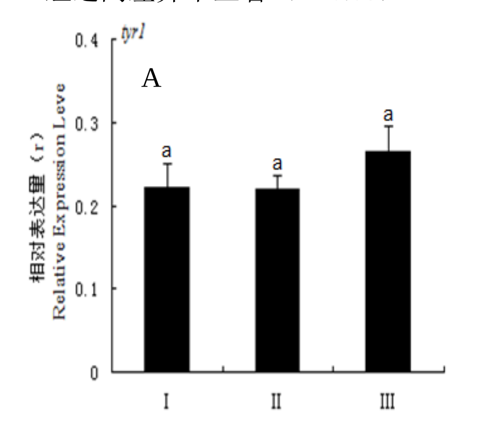
I　II　III

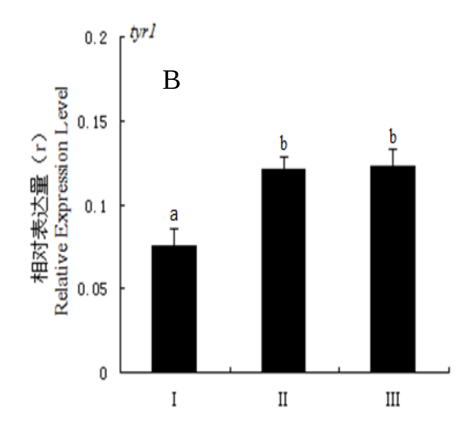
图 2　饲粮蛋白质水平对工蜂 *Nmdar*1 相对表达量的影响

Fig.2　Effects of dietary protein level on the relative expression level of *Nmdar*1 of worker bees

2.4　饲粮蛋白质水平对工蜂 *Tyr*1 相对表达量的影响

试验结果如图 3 所示。各试验组刚出房和 20 日龄工蜂的 *Tyr*1 相对表达量差异均不显著（*P*>0.05）。II组和III组 10 日龄工蜂的 *Tyr*1 相对表达量显著高于I组（*P*<0.05），但II组与III组之间差异不显著（*P*>0.05）。





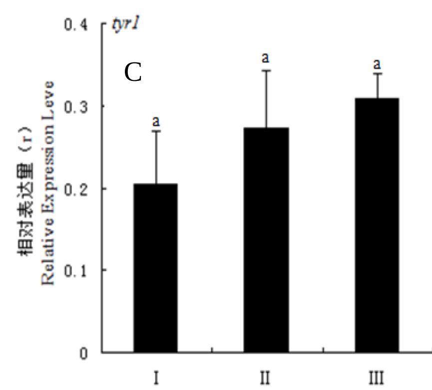


图 3　饲粮蛋白质水平对工蜂 *Tyr*1 相对表达量的影响

Fig.3　Effects of dietary protein level on the relative expression level of *Tyr*1 of worker bees

3　讨　论

蜜蜂是一种全变态昆虫，个体发育要经过卵、幼虫、蛹和成虫 4 个阶段，其中幼虫阶段和成虫阶段需要进食、消化与吸收营养食物。成虫阶段蜜蜂（工蜂）进食的天然食物主要是花粉和蜂蜜。幼虫阶段的前期主要由工蜂分泌蜂王浆进行饲喂，其蜂王浆的营养成分与工蜂进食的食物有关。幼虫阶段的后期由工蜂饲喂蜂粮，即花粉和蜂蜜的混合发酵物。然而，在外界缺少蜜粉源的早春，养蜂生产者常常使用花粉代用品（蛋白质饲粮）和糖水。不同蛋白质水平的花粉代用品对蜜蜂个体体重、咽下腺发育以及抗氧化性能具有明显的影响[8-12]，从而影响着蜂群的群势和产浆性能等。本试验发现，II组和III组采集蜂在 1 000、2 000 m 处的回归率均显著高于I组，但II组与III组之间差异不显著。这说明蜜蜂饲粮中蛋白质水平过低会影响采集蜂的归巢能力。其主要原因在于刚出生的工蜂在后期发育时需要大量蛋白质来使自身机体进一步发育成熟，过低的蛋白质水平会影响工蜂的后期发育，从而使其生理机能下降，导致其归巢能力降低。

GluRA 广泛存在于中枢神经系统内，在西方蜜蜂中被认为是一种促代谢性的谷氨酸受体基因，并影响着蜜蜂的长期学习记忆能力，是蜜蜂学习记忆生理过程的关键神经递质[7]。本试验发现，III组 10 和 20 日龄工蜂的 *GluRA* 相对表达量均显著高于II组和I组，且II组工蜂的 *GluRA* 相对表达量也显著高于试验I组。这说明蛋白质水平显著影响 10 和 20 日龄工蜂的 *GluRA* 的表达。工蜂刚出房后需要采集高蛋白质水平饲粮使其自身内部器官得到进一步发育，从而完善其机体机能，特别是为了后期采集花粉、花蜜，需要良好的长期记忆能力，从而提高采集归巢能力。

*Nmdar*1 与西方蜜蜂学习记忆有关，并广泛存在于蜜蜂大脑的蘑菇体凯恩细胞和其他神经

器官中[6]。本试验发现，II组和III组 10 和 20 日龄工蜂的 *Nmdar*1 相对表达量显著高于I组，但II组与III组之间差异不显著。这说明饲粮蛋白质水平过低影响着工蜂脑部神经器官的发育，从而降低了记忆相关基因的表达，影响着蜜蜂的归巢能力，这与蜜蜂放飞归巢试验结果一致。

*Tyr*1 是昆虫体内重要的神经递质，调控昆虫飞行以及学习与记忆等生理行为[16-17]，也是一种参与西方蜜蜂学习记忆的重要基因[5]。本试验发现，II组和III组 10 日龄工蜂的 *Tyr*1 相对表达量显著高于I组，但II组与III组之间差异不显著。这说明不同蛋白质水平饲粮对工蜂 *Tyr*1 表达有一定的影响，过低的蛋白质水平影响着工蜂的记忆能力。然而，饲粮蛋白质水平对 20 日龄工蜂的 *Tyr*1 相对表达量的影响不显著，主要原因可能是 *Tyr*1 与调节蜜蜂短时记忆有关，如蜜蜂认巢试飞，而与蜜蜂采集时的长期记忆无关。何旭江[13]研究发现，蜜蜂的首次认巢认飞活动主要集中在 7～11 日龄，即此日龄段需要较高的 *Tyr*1，具体原因有待于进一步研究与分析。

另外，本试验还发现，刚出房蜜工蜂间的 *GluRA*、*Nmdar*1 和 *Tyr*1 相对表达量各试验组之间差异不显著，可能是因为工蜂采食不同蛋白质水平饲粮后，其分泌的蜂王浆中的一些主要活性因子差异不显著，如 10-羟基-癸烯酸（10-HAD，又称王浆酸）[18]，对蜜蜂幼虫发育影响较小，具体原因有待于进一步深入研究。

4 结 论

饲粮蛋白质水平影响意大利蜜蜂记忆相关基因的表达，进而影响其归巢能力。在日常饲喂蜂群时，饲粮蛋白质水平不应低于 25%。

致谢：感谢山东农业大学胥保华教授团队提供试验蛋白质饲粮！

参考文献：

[1] 曾志将.养蜂学[M].2 版.北京:中国农业出版社,2009.

[2] COX-FOSTER D L,CONLAN S,HOLMES E C,et al.A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder[J].Science,2007,318(5848):283–287.

[3] OLDROYD B P.What’s killing American honey bees?[J]PLoS Biology,2007,5(6):e168.

[4] 陈盛禄.中国蜜蜂学[M].北京:中国农业出版社,2001.

[5] BLENAU W,BALFANZ S,BAUMANN A.Am*tyr1*:characterization of a gene from honeybee

(*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor[J].Journal of Neurochemistry,2000,74(3):900–908.

[6] ZACHEPILO T G,LL’INYKH Y F,LOPATINA N G,et al.Comparative analysis of the locations of the NR1 and NR2 NMDA receptor subunits in honeybee (*Apis mellifera*) and fruit fly (*Drosophila melanogaster*,Canton-S wild-type) cerebral ganglia[J].Neuroscience and Behavioral Physiology,2008,38(4):369–372.

[7] KUCHARSKI R,MITRI C,GRAU Y,et al.Characterization of a metabotropic glutamate receptor in the honeybee (*Apis mellifera*):implications for memory formation[J].Invertebrate Neuroscience,2007,7(2):99–108.

[8] 王改英,吴在富,杨维仁,等.饲粮蛋白质水平对意大利蜜蜂咽下腺发育及产浆量的影响[J].动物营养学报,2011,23(7):1147–1152.

[9] 王改英,李振,杨维仁,等.日粮蛋白质水平对浙农大 1 号意大利蜜蜂产浆及咽下腺发育的影响[J].江西农业大学学报,2011,33(6):1176–1180.

[10] 李成成,杨维仁,胥保华,等.意大利蜜蜂生长发育适宜蛋白供给水平及其对幼虫抗氧化活性的影响[J].中国农业科学,2011,44(22):4714–4720.

[11] 王改英,杨维仁,胥保华.饲粮蛋白质水平对蜂群繁殖性能的影响[J].应用昆虫学报,2012,49(2):486–489.

[12] 刘俊峰,吴小波,颜伟玉,等.饲粮蛋白水平对中华蜜蜂春繁性能及幼虫抗氧化性能的影响[J].江西农业大学学报,2011,33(5):960–964.

[13] 何旭江.蜜蜂 RFID 技术及中蜂与意蜂学习记忆比较[D].硕士学位论文.南昌:江西农业大学,2011.

[14] 秦秋红.东方蜜蜂与西方蜜蜂学习记忆比较及蜜蜂学习记忆相关分子机理分析[D].硕士学位论文.南昌:江西农业大学,2013.

[15] HUANG Q,KRYGER P,LE CONTE Y,et al.Survival and immune response of drones of a *Nosemosis* tolerant honey bee strain towards *N.ceranae* infections[J].Journal of Invertebrate Pathology,2012,109(3):297–302.

[16] ROEDER T.Tyramine and octopamine:ruling behavior and metabolism[J].Annual Review

of Entomology,2005,50:447–477.

[17] ROEDER T.Octopamine in invertebrates[J].Progress in Neurobiology,1999,59(5):533–561.

[18] 赵发,孙阳恩,王改英,等.不同蛋白水平的饲粮对蜂王浆品质的影响[J].中国蜂业,2011,62:14–17.

Effects of Dietary Protein Level on Homing Capability and Memory Related Gene Expression of *Apis mellifera ligustica*

YUAN An GUO Yahui WU Xiaobo* HUANG Xiao LIAO Chunhua

(*Honeybee Research Institute*, *Jiangxi Agricultural University*, *Nanchang* 330045, *China*)

Abstract: The objective of this experiment was to explore the effects of dietary protein level on homing capability and memory related gene expression of *Apis mellifera ligustica*. Nine colonies of *Apis mellifera ligustica* with equal colony population were randomly divided into 3 groups with 3 replicates in each group. Bees in groups Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ were fed diets containing 15%, 25%, 35% protein, respectively. In this study, the homing rate of foragers in the 1 and 2 km away afeter feeding 45 days and the expression levels of three memory related genes [glutamate receptor type A gene （*GluRA*）, N-methyl-*D*-aspartic acid receptor type 1 gene（*Nmdar*1） and tyramine receptor type 1 gene （*Tyr*1）] in different day-old (newly emerged, 10-day-old and 20-day-old) worker bees were detected. The results showed that the homing rates in the 1 and 2 km away in groups Ⅱ and Ⅲ were significantly higher than those in group Ⅰ (P<0.05), while there was no significant difference between groups Ⅱ and Ⅲ (P>0.05). The expression level of *GluRA* of 10-day-old and 20-day-old woker bees in group Ⅲ was significantly higher than that in groups Ⅰ and Ⅱ (P<0.05), and that in groups Ⅱ was significantly higher than that in group Ⅰ (P<0.05). The expression level of *Nmdar*1 of 10-day-old and 20-day-old worker bees in groups Ⅱ and Ⅲ was significantly higher than that in group Ⅰ (P<0.05), but there was no significant difference between groups Ⅱ and Ⅲ (P>0.05). The expression level of *Tyr*1 of 10-day-old worker bees in groups Ⅱ and Ⅲ was significantly higher than that in group Ⅰ (P<0.05), but there was no significant difference between groups Ⅱ and Ⅲ (P>0.05), Besides

---

*Corresponding author, associate professor, E-mail: wuxiaobo21@163.com (责任编辑 菅景颖)

that, there were no significant differences in the expression levels of *GluRA*, *Nmdar*1 and *Tyr*1 of newly emerged worker bees among the three groups ($P>0.05$), and the expression level of *Tyr*1 of 10-day-old worker bees among the three groups also had no significant difference （$P>0.05$）. In conclusion, the lower level of protein in the diet would infect the homing ability and the expression of memory related genes of *Apis mellifera ligustica*.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; protein level; homing rate; memory genes